GC-ECD への直接注入による魚油中の PCB 分析: Deans スイッチデバイスを用いたバックフラッシングの結果

アプリケーション

環境および製薬

著者

Philip L. Wylie
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

要約

電子捕獲型検出器 (ECD) 2 台を装備した Agilent 7890A ガスクロマトグラフ (GC) に、キャピラリフローテクノロジーを採用した Deans スイッチが組み込まれたシステムで、今回の検討を行いました。本アプリケーションで、魚油中のポリ塩化ビフェニル (PCB) 汚染を分析するためのメソッドが開発されました。Deans スイッチを使用して、第 2 カラムでの分離のために 7 種類の指標 PCB (IUPAC 同族体番号 28、52、101、118、138、153、180) を第 1 の DB-XLB カラムから第 2 の DB-200 カラムにハートカットしました。栄養補助食品カプセルの魚油をイソオクタンで 1:10 に希釈したサンプルを直接注入しました。分離実験では、バックフラッシュせずに、水素炎イオン化検出器の付いた GC (GC/FID) で魚油を分析しました。この分析から、17.4 分の GC/ECD 分析の後に魚油成分の約 2/3 の高沸点成分がカラムに残留する危険性が確認されました。残留、汚染、リテンションタイムのずれを防ぐために、Deans スイッチを使用して各分析終了時に第 1 カラムをバックフラッシュしました。バックフラッシュにより魚油残留物がカラムから除去されたことが分かりました。バックフラッシュを用いないとクロマトグラフの質はすぐに劣化するであろうことが懸念されました。

緒言

魚油には、有益な健康効果を持つと考えられるエイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA)、オメガ-3 脂肪酸が高濃度で含まれています。魚を食べるだけでなく、多くの人々は魚油を日々の食生活に対する栄養補助食品として摂取しています。しかし魚、特に水中食物連鎖で上位にいる魚は、脂溶性汚染物質を生物濃縮する可能性があります。この中には、ポリ塩化ジベンゾジオキシン (PCDD)、ポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF)、ポリ塩化ビフェニル (PCB) が含まれます。そのため栄養補助食品に使用される魚油は、ハロゲン化汚染物質の検査を含む様々な分析を行う必要があります。

品質保証試験の 1 つに、魚油の PCB 汚染を分析するものがあります。魚油は炭素鎖長が主に 14 ～ 22 の高沸点脂肪酸や脂肪酸のトリグリセリドを含む非常に複雑なマトリックスであるため、この分析は複雑なものとなります。これには、様々な量のリン脂質、グリセリンエーテル、ワックスエーテル、脂肪アルコールも含まれます。PCB 分析は、209 種類の同族体からなるため、それ自体でも非常に複雑になります。そのうち 140 ～ 150 種類が、アロクロール (日本ではカネクロール) と呼ばれる市販の PCB マトリックスで確認されています。PCB 分析では通常、12 種類のダイオキシン類に属するコプラナー PCB および/または指標 PCB (IUPAC 番号 28、52、101、118、138、153、180) に焦点を当てて分析します。

これらの化合物に対して十分な感度および選択性を得るために、従来分析に携わる者は、高分解能マススペクトル (HR/MS) または HR/MS/MS などの非常にコストのかかる方法を採用してきました。魚油の分析は、一般的には一連の抽出およびクリーンアップステップを行う必要がありました。この論文では、Deans スイッチ、異なる選択性のカラム 2 本、電子捕獲型検出器 (ECD) 2 台が組み込まれた Agilent 7890A GC を使用し、魚油中の 7 種類の指標 PCB の分析について検討を行いました。市販の栄養補助食品の魚油を単にイソオクタンで 10:1 に希釈し、直接 GC に注入しました。クリーンアップステップは行いませんでした。

実験

魚油栄養補助食品は地元の食料品店で入手しました。瓶のラベルによると、各ゼラチンカプセルには魚油 1.0 g に対し、EPA が 180 mg、DHA が 120 mg が含まれます。カプセルから油を取り出し、イソオクタン (農薬グレード、Sigma Aldrich、Aldrich、Mileaukee、WI、USA) で希釈し、10% 溶液試料を調製しました。様々な種類のアロクロール標準試料 (Supelco、Bellefonte、PA、USA) または個々の成分の PCB 同族体標準試料 (AccuStandard、New Haven、CT、USA) をこの溶液にスパイクしました。

表 1 に本検討に用いた分析装置および分析条件を示します。

表 1　　装置および分析条件

装置およびソフトウェア	
ガスクロマトグラフ	Agilent 7890A
オートサンプラ	Agilent 7683B シリーズインジェクタおよびトレイ
第 1 カラム	J&W 30 m × 0.18 mm × 0.18 µm DB-XLB (P/N 121-1232)
第 1 カラム接続	スプリット/スプリットレス注入口と Deans スイッチの間
第 2 カラム	J&W 30 m × 0.25 mm × 0.50 µm DB-200 (P/N 122-2033)
第 2 カラム接続	Deans スイッチとバック ECD の間
抵抗管	76.8 cm x 0.100 mm、不活性処理済みフューズドシリカチューブ
抵抗管接続	Deans スイッチとフロント ECD の間
注入口ライナ	Agilent 不活性化処理済みシングルテーパガラスウール入 (P/N 5062-3587)
Aux 圧力コントロールデバイス	Agilent 7890A ニューマティックコントロールモジュール (PCM) オプション #309
Deans スイッチカリキュレータソフトウェア	Agilent Technologies Deans スイッチカリキュレータ (リビジョン A.01.01)
データ取込および解析用ソフトウェア	Agilent GC ChemStation (リビジョン B.03.01)
装置の分析条件	
注入口	スプリット/スプリットレス、330 ℃
オーブン温度プログラム	80 ℃ (1 分)、→ 50 ℃/分 → 200 ℃ (0 分) → 10 ℃/分 → 290 ℃ (5 分)
検出器	ECD 2 台、340 ℃
ECD メークアップガス	N_2、60 mL/min
注入口圧力	H_2、41.040 psig (コンスタントプレッシャー モード)
Deans スイッチへの PCM プレッシャー	H_2、20.610 psig (コンスタントプレッシャー モード)
ポストランバックフラッシュ条件	
ポストランタイム	2.4 分
注入口圧力	H_2、0 psig
PCM 圧力	H_2、80 psig
バックフラッシュオーブン温度	290 ℃ (2.4 分間)

結果と考察

バックフラッシュを行わない場合、魚油中の高沸点成分が GC カラムに残留する危険性があり、分析を繰り返すことにより、深刻な残留問題を生ずることが懸念されます。数回の注入後、非常に多くの魚油残留物がカラムに蓄積することにより、PCB のリテンションタイムを 1 分以上ずれる原因となります。Deans スイッチを使用すると、このような劇的なリテンションタイムのずれを防ぐことができます。ハートカットを行う時間はわずか数秒となります。

Deans スイッチ - ハートカットデバイス

Deans スイッチは、キャピラリフローテクノロジーを搭載した Agilent の最新のデバイスの 1 つです。このデバイスは極めて少ないデッドボリュームを持ち、不活性で、オーブン温度の大きな変動を繰り返してもリークがありません。カラムを Deans スイッチと接続するのは簡単で、デバイスをオーブンの壁側面に取り付けることができます (図 1)。

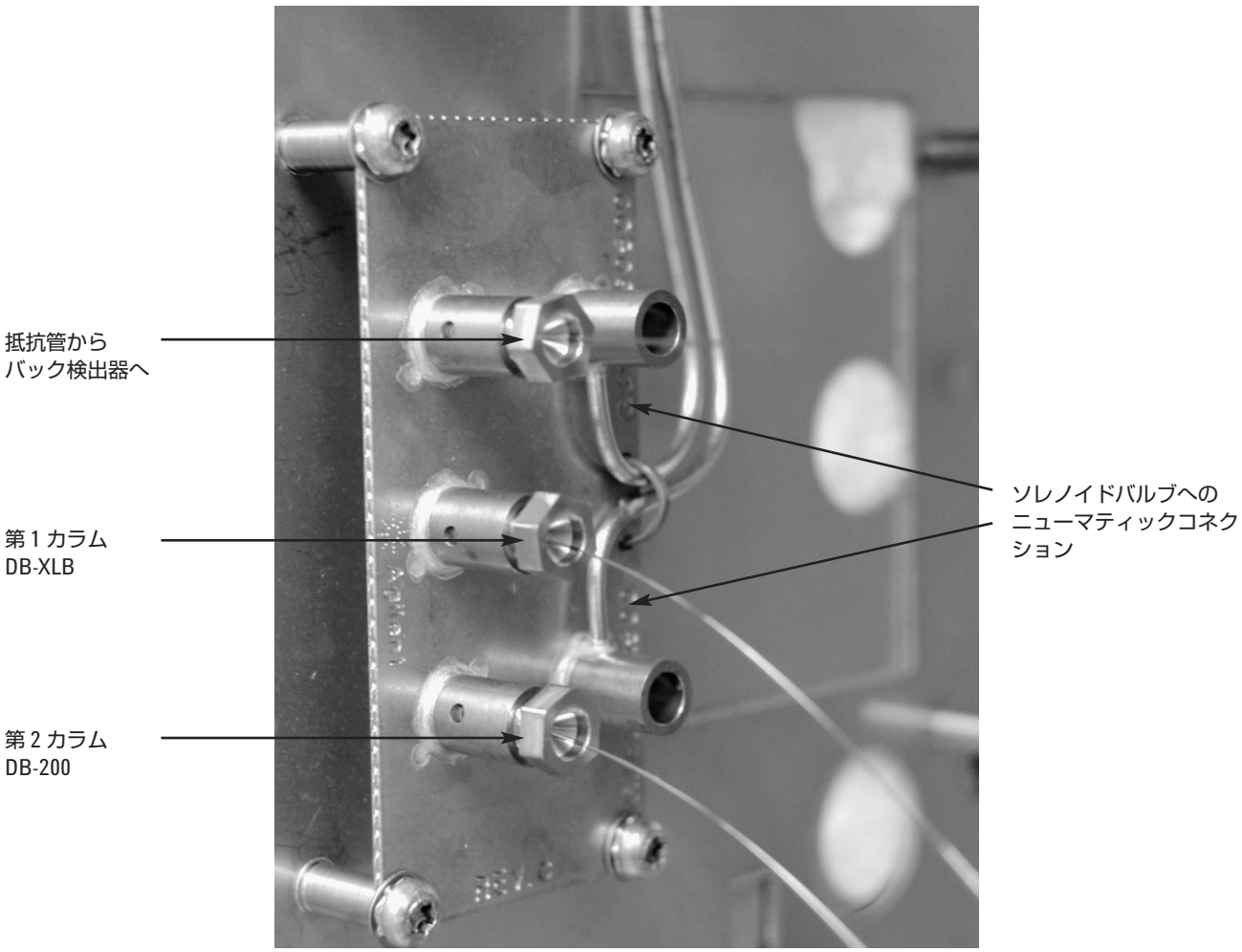

図 1　　7890A GC オーブン側面に設置された Deans スイッチの写真。カラムおよび抵抗管の接続は、図 2a * で示します。

図 2a に示すように、30 m x 0.18 mm x 0.18 µm DB-XLB カラムはスプリット/スプリットレス注入口と Deans スイッチの間に接続されます。短い長さの不活性化処理済みフューズドシリカチューブ：抵抗管 (76.8 cm x 0.100 mm) を、Deans スイッチとフロント ECD の間を接続します。DB-XLB カラムより極性が強く、PCB に対して異なる分離能を持つ液相の第 2 カラム (30 m x 0.25 mm x 0.5 µm DB-200) が選ばれました。このカラムは、使用最高温度が 300 ℃以上であり、対象の PCB が溶出するのに十分高い温度となります。

図 2a には、ソレノイドバルブが「オフ」位置にある「通常」モードの Deans スイッチを示します。このモードで、1 番目の DB-XLB カラムからの溶出物はリストリクタからフロント ECD に向けられます。ソレノイドバルブが切り換え、「オン」の位置になると、溶出物は 2 番目の DB-200 カラムからバック ECD に向けられます (図 2b)。始めに、バルブを「オフ」位置にして 7 種類の指標 PCB のリテンションタイムを測定しました。ChemStation のタイムイベントテーブルを利用して、バルブを各 PCB ピークの直前に「オン」に、そしてその直後に「オフ」に設定し、ハートカットの切り換えを行いました。こうして、DB-200 カラムからバック ECD に導かれた 7 回のハートカットを行いました。

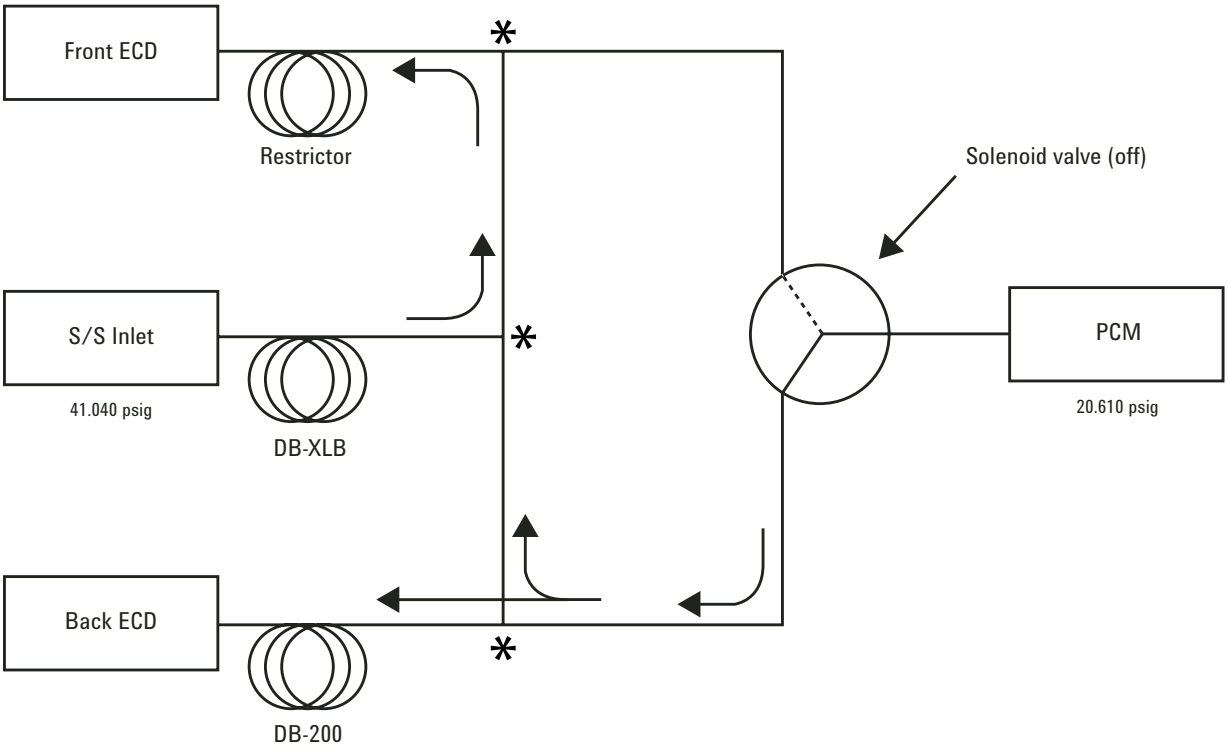

図 2a　「オフ」位置の Deans スイッチ（カットしない）。DB-XLB カラムからの溶出物は、短いリストリクタからフロント ECD に直接流れます。* 印の付いた交点は、Deans スイッチプレートへのカラムおよび抵抗管の接続の位置を示します (図 1)。

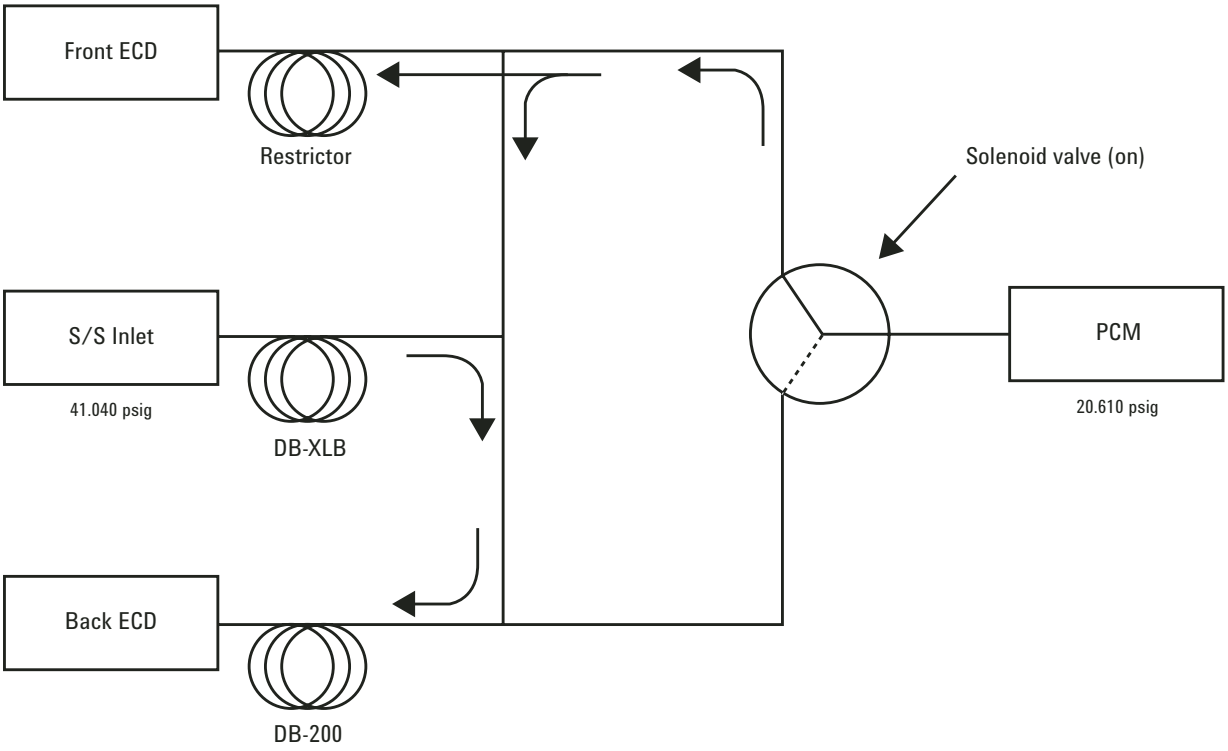

図 2b　「オン」位置の Deans スイッチ (カットする)。DB-XLB カラムからの溶出物は DB-200 カラムにハートカットされ、その後にバック ECD に流れます。

一部の Deans スイッチシステムでは、第 2 カラム専用に別の GC オーブンが必要になったり、低温冷媒を用いて第 2 カラムの先端でハートカット成分をフォーカシングする必要がありました。本検討では、両方のカラムとも一つの 7890A オーブンの内に取り付けることができ、DB-200 カラムの先端で化合物をフォーカシングをするための冷媒の必要もありませんでした。

図 3a には、アロクロール 1260 をスパイクした魚油サンプルのクロマトグラムを示します。PCB 28、52、101、118、138、153、180 は 1 番目のクロマトグラムのハートカットで (図 3b)、第 2 カラムに導かれました (図 3c)。DB-200 カラムの目的は、1 番目の DB-XLB カラムだけでは同一リテンションタイムに溶出し分離不可能な他の PCB 成分やマトリックス成分から対象 PCB を分離することです。7 成分の PCB の内 6 成分は、DB-200 カラムで確実に分離することが確認できました。PCB 118 だけは、このメソッドでは完全分離はできませんでした。

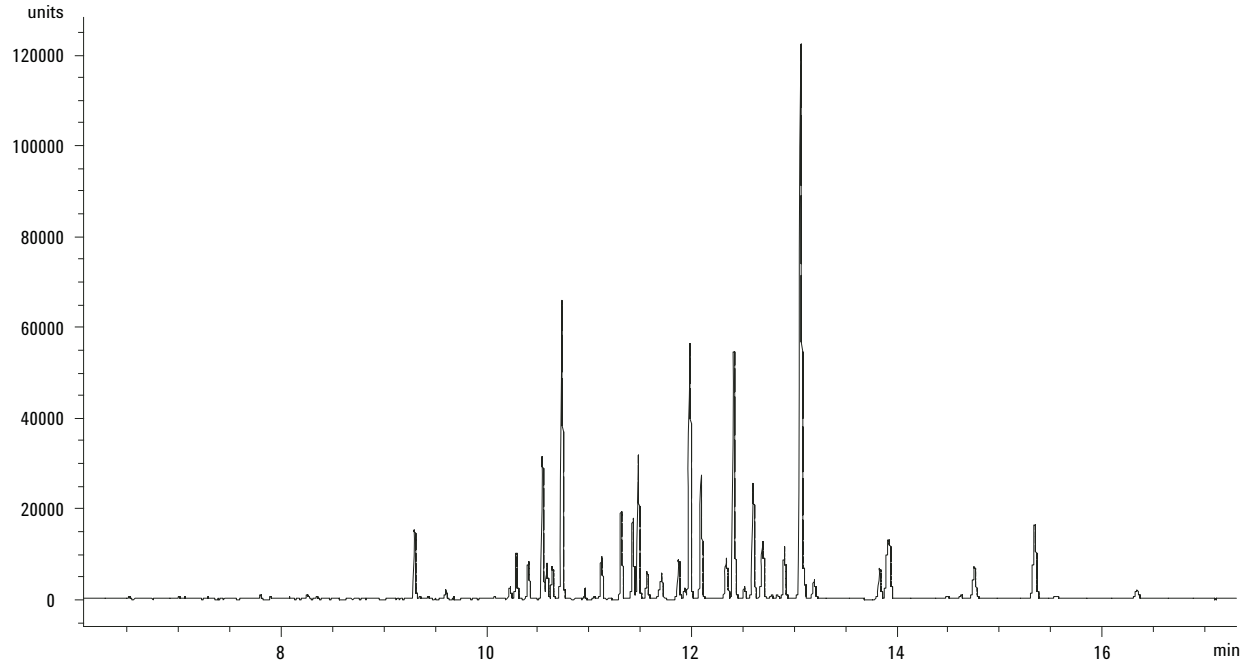

図 3a　　魚油にスパイクされたアロクロール 1260 の GC/ECD クロマトグラム。これは、7 つのハートカットをするための 1 番目の DB-XLB カラムから溶出したフロント ECD のクロマトグラムです。

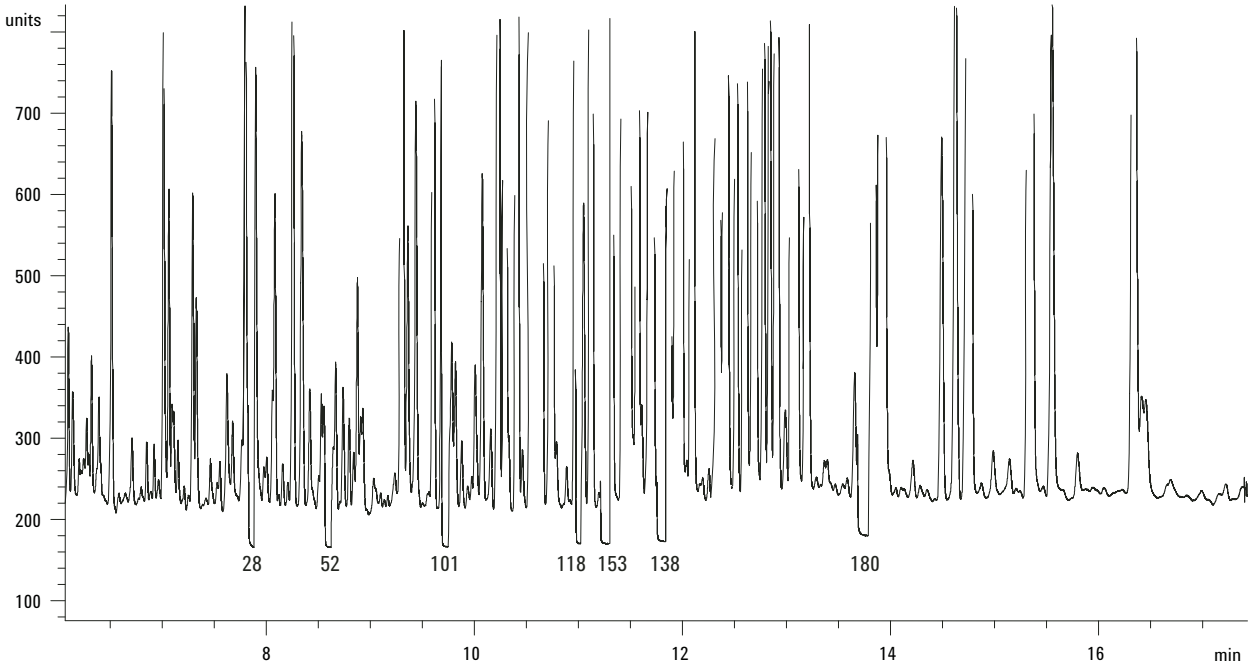

図 3b　　7 種類の指標 PCB に行ったハートカットを示す図 3a のクロマトグラムの拡大図

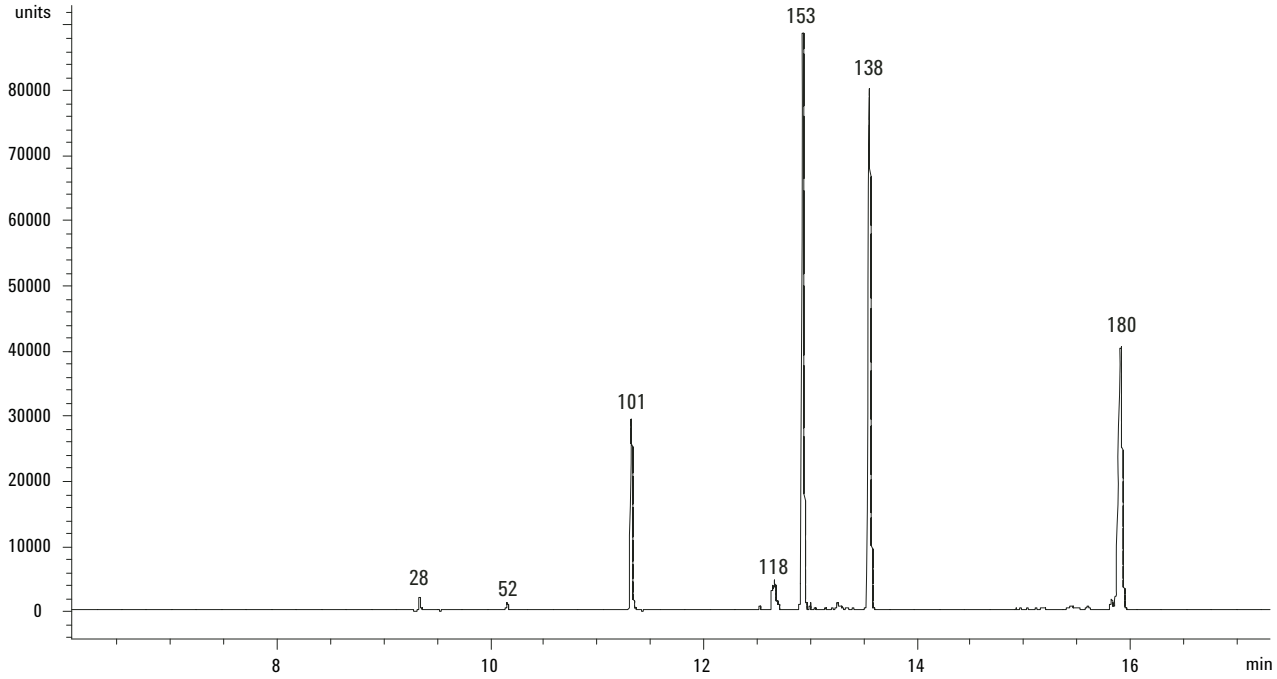

図 3c　2 番目の DB-200 カラムからの GC/ECD クロマトグラム。このクロマトグラムのピークは DB-XLB カラムからのハートカットで DB-200 カラムに導かれ、分離したものです。同族体番号 118 以外は、対象 PCB は DB-200 カラムによる同時に溶出したマトリックスの干渉を受けることなく分離できました。

Deans スイッチ - バックフラッシュ

Deans スイッチシステムを使用したデータ取込は、最終オーブン温度 290 ℃、ランタイム 17.4 分で終了することができました。このポイントで多くの魚油成分がカラムに残ることが懸念されましたが、ECD がではこれらの化合物に対して応答性がほとんどないため、残留すると断言できませんでした。ECD のレスポンスでは、魚油はクロマトグラムの一部の小さなピーク (正と負の両方) の原因となりますが、魚油の全ての成分に寄与することを確かめることはできません。そのため魚油のサンプルを、Deans スイッチデバイスがなく、水素炎イオン化検出器 (FID) を装着した GC を使用して、同一の DB-XLB カラムを用いて分析しました。高沸点化合物が 17.4 分以降もまだ溶出するかを判断するために、290 ℃で最終オーブンホールド時間を 25 分間追加しました。

図 4 から、多量の魚油が 17.4 分後 (図の矢印) の溶出の原因になったことが分かりました。ブランクランで最終オーブン温度を 310 ℃で行った場合、さらに多くの魚油成分がカラムから溶出していることが確認できました (図 4、中段のクロマトグラム)。2 回目のブランクラン (図 4、上段のクロマトグラム) から、魚油成分がまだカラムから溶出していることが分かりました。実際には、Deans スイッチ条件では約 1/3 だけの魚油がカラムから溶出し、残りの約 2/3 はカラムに残留します。このため、従来の魚油メソッドでは溶媒抽出した後、サンプルクリーンアップのために固相抽出を行うことが通常必要とされてきました。

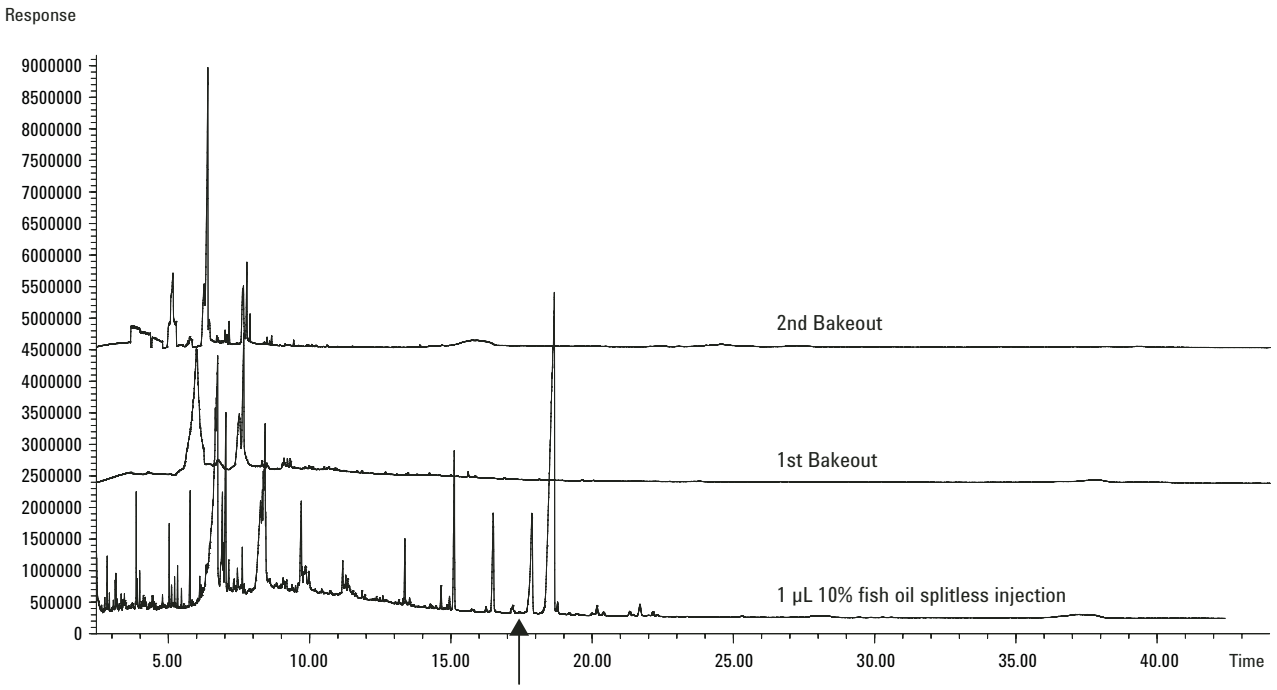

図 4　30 m x 0.18 mm x 0.18 µm DB-XLB カラムを使用して、10% 魚油を 1 µL スプリットレス注入した GC/FID クロマトグラム。矢印は、GC/ECD メソッドが終了し、ポストランバックフラッシュが始まる時間を示します。この場合、バックフラッシュは行わなかったため、オーブンは 290 ℃で最終オーブンホールド時間を更に 25 分間ホールドしました。注入は行わず (ブランクラン)、分析終了後にオーブンを 310 ℃で 30 分間ホールドし、ブランクランをさらに 2 回繰り返しました。2 回目の空焼きステップ中にも、魚油に起因する残留物は溶出し続けました。

7890A は、カラムバックフラッシュをルーチンで操作できるようにするように設計されました。ホールドアップタイムの約 5 倍の間、バックフラッシュを続ける必要があることが実験で分かりました。この場合、カラムはポストランバックフラッシュの間、290 ℃で保持されました。同時に、PCM プレッシャーが 80 psig に引き上げられる一方、注入口プレッシャーは 0 psig まで下げました。Agilent の GC プレッシャーフローカリキュレータソフトウェアを使用して、カラムから逆流させたの H_2 流量は、3.81 mL/min で、ホールドアップタイムは 0.466 分と計算されました。その結果、バックフラッシュは 2.4 分間と考えました。この時間は計算したホールドアップの値の 5 倍をやや上回ります。図 5 はバックフラッシュモードの Deans スイッチを示します。

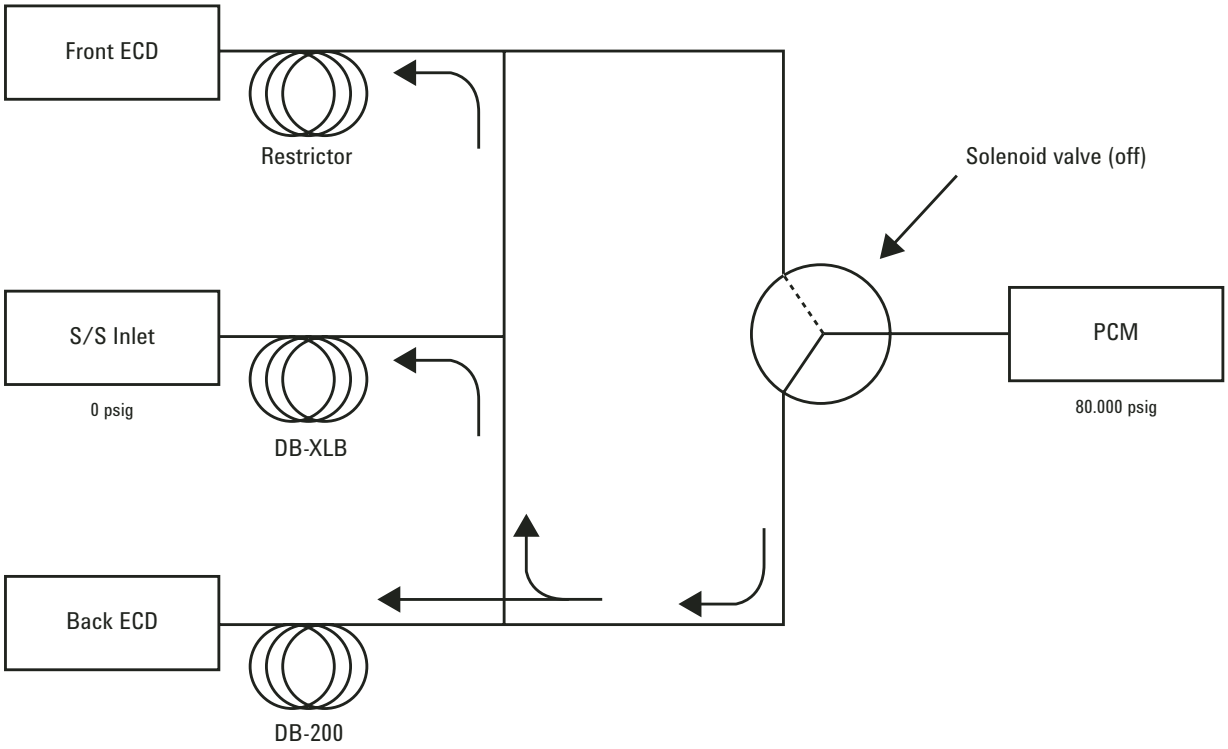

図 5　「バックフラッシュ」モードの Deans スイッチ。PCM プレッシャーが 80 psig に引き上げられる一方、注入口プレッシャーは 0 (または 1) psig に落とされます。これによりキャリアガスは DB-XLB カラムを逆流します。逆流により、高沸点魚油成分がカラム先端から一掃され、スプリットベントの外に溶出されます。

前述のとおり、魚油をほんの数回注入すると、PCB のリテンションタイムを劇的にずれを起こすさせる可能性があります。バックフラッシュすると、残っている魚油残留分は第 1 カラムから逆に押し出され、スプリットベントから溶出されます。これにより、魚油がカラムに蓄積することを防ぐことができるため、残留やリテンションタイムのずれを排除することができます。図 6a では連続した 6 回の分析シーケンスの最初と最後のクロマトグラムを比較します。10% 魚油の溶液にアロクロール 1260 をスパイクしたサンプルを 1 µL スプリットレス注入して検討を行いました。このメソッドの条件で魚油を事前に多く注入した後、このシーケンスを実行しまた。リテンションタイムがずれなかったことは明確に確認できます。

図 6b には、図 6a の 2 つの分析からハートカットされた 7 種類の PCB のクロマトグラムを示します。図 6b からは、最初と最後のハートカットクロマトグラムに差がないことが分かり、PCB リテンションタイムのわずかなずれもなかったことが証明できます。各ハートカットの時間は 4 ～ 5 秒と狭いため、1 番目のカラムでリテンションタイムのずれが非常に少ないことが、2 番目のカラムでの分離を劇的に良好になったことに繋がったということができます。

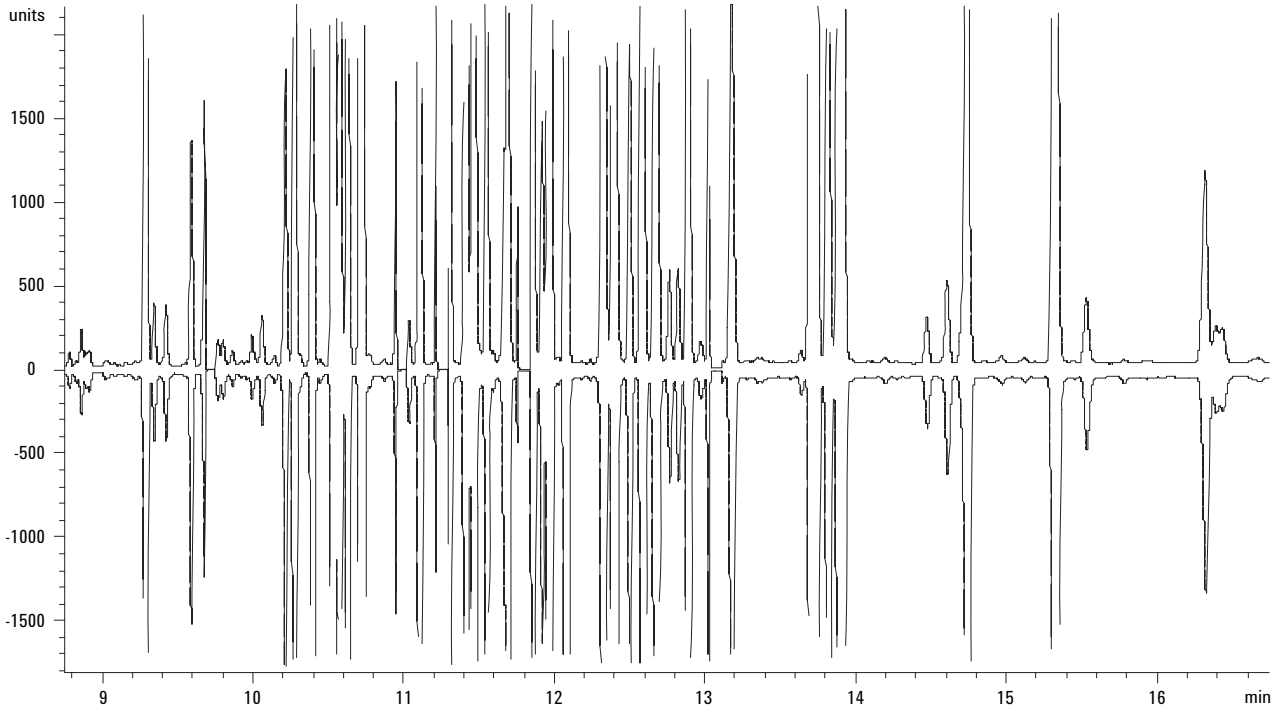

図 6a　アロクロール 1260 をスパイクした 10% 魚油サンプルの最初 (上) と 6 回目 (反転した) の注入したクロマトグラム。PCB 28、52、101、118、138、153、180 を分離させるために、この DB-XLB カラムから 7 回の Deans スイッチカットが行われました。各分析後に DB-XLB カラムをバックフラッシュし、魚油残留物の蓄積を防ぎました。魚油の蓄積によるリテンションタイムのずれはなかったことが、この比較から分かります。

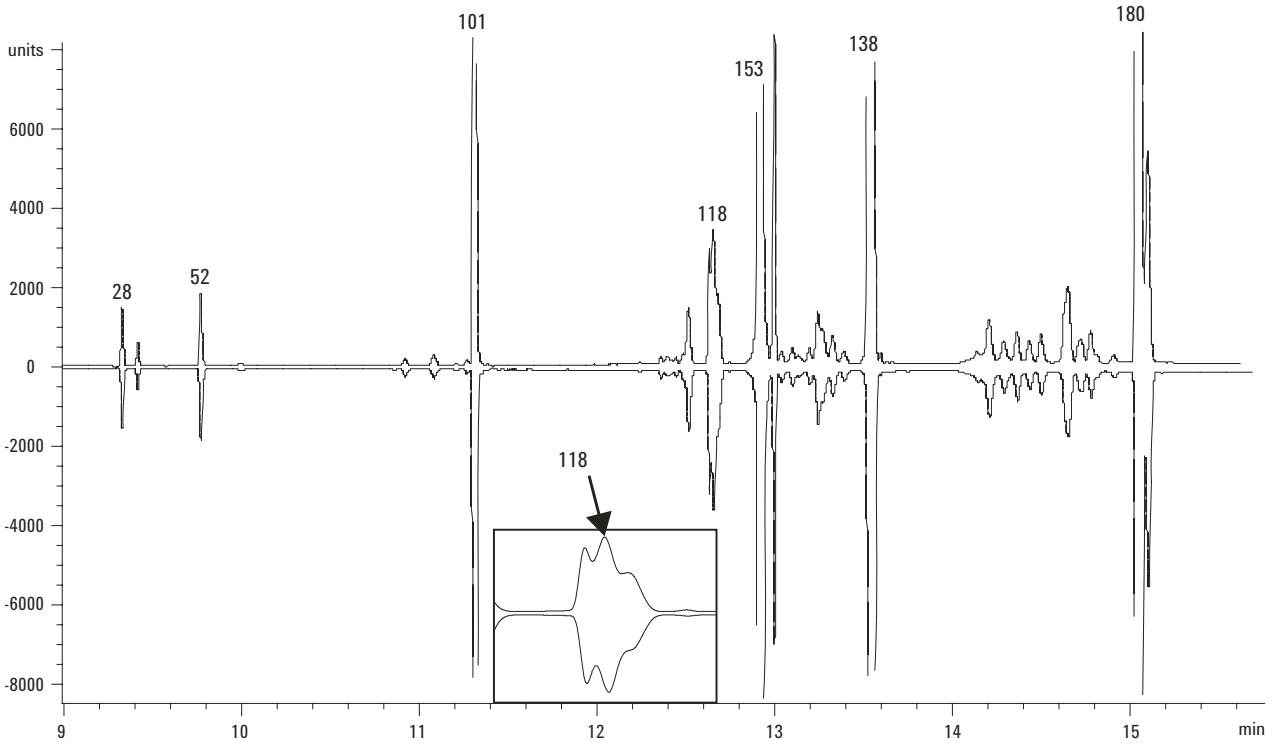

図 6b　7 種類の PCB 同族体のクロマトグラムと、DB-XLB カラムから DB-200 までにカットされた干渉。最初 (上) と 6 番目 (反転した) のクロマトグラムは同一で、リテンションタイムの安定性を示す追加の証拠となります。第 1 カラムでリテンションタイムのずれが生ずると、2 番目のクロマトグラムの形状は大きく変わることになると思われます。

結論

本検討では、GC 注入の前処理として手間のかかるサンプルクリーンアップを行わずに、魚油を直接 GC に注入し、魚油中の PCB 分析ができることを証明しました。DB-200 カラムでさらに分離を改善するために、Deans スイッチを使用して 7 種類の指標 PCB (28、52、101、118、138、153、180) を DB-XLB カラムからハートカットしました。これにより、指標 PCB のベースライン分離がほぼできました。同族体 118 だけが、同時に溶出する PCB から完全に分離できませんでした。この同族体を分離するには、オーブン温度プログラムをさらに改良することが必要になるものと思われます。

分析終了時に魚油の約 2/3が第 1 GC カラムに残ったと推定されました。各分析後に 2.4 分間だけ Deans スイッチをバックフラッシュモードに設定することで、この物質をカラムから逆に一掃し、スプリットベントの外に溶出させました。リテンションタイムのずれや分析間の残留の痕跡はありませんでした。

詳細情報

弊社製品とサービスについて更に詳しい情報をご希望のお客様は弊社 Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

本資料に記載された情報は研究目的での使用のみを対象としたもので、その後の診断手順ではありません。

Agilent は、万一この資料に誤りが発見されたとしても、また、本資料の使用により付随的または間接的に損害が発生する事態が発生したとしても一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2007

Printed in Japan
January 5,2007
5989-6095JAJP

Agilent Technologies